Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 465-478

The Effect of Time and Different Concentrations of Sodium Hypochlorite, Carbendazim Fungicide and Mercuric Chloride in Inhibiting the Contamination of *Fritillaria* spp. Bulbs in Tissue Culture Environment

L. Moradi[1], S.N. Mortazavi [2*], M. Alaei[2]

1 and 2- Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mortazavi46@gmail.com)

Received:	27-01-2024	**How to cite this article:** Moradi, L., Mortazavi, S.N., & Alaei, M. (2024). The effect of time and different concentrations of sodium hypochlorite, carbendazim fungicide and mercuric chloride in inhibiting the contamination of *Fritillaria* spp. bulbs in tissue culture environment. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 465-478. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322
Revised:	20-03-2024	
Accepted:	05-04-2024	
Available Online:	05-04-2024	

Introduction

Success in tissue culture technique, especially in bulbous plants, depends on the microbial contamination control during in vitro culture. Decontamination is considered as a fundamental challenge in the technique of cell, tissue and plant organ culture. Although there are various methods for this purpose, the development of disinfection methods specific to each species is considered an important factor in the establishment and success of the tissue culture system. Applying different treatments can control the microbial contamination and consequently increase the percentage of explant survival. This plant is among the poisonous plants of pastures and the chemical compounds present in it have important medicinal effects, so that the existence of alkaloid and glycosidic compounds has been reported for it. These chemical compounds are used to treat rheumatic pains, lymphatic system diseases and also as liver cleansers. This ornamental plant also has the ability to produce pots and its export is possible in pots . Currently, in order to overcome the issues of the usual methods of propagation of this ornamental plant and to produce pollution-free plants, the use of in vitro cultivation methods in this plant has become very important. bulbes is one of the most common explants of inverted tulip tissue culture, but it often faces very high internal and external fungal and bacterial contamination. In the in vitro culture of onion plants, the existence of fungal and bacterial contaminations are one of the main problems that can affect the efficiency of this type of propagation methods. Fungal and bacterial contaminations are one of the most important problematic factors in different in vitro culture methods. Internal contamination usually appears several weeks after planting. These contaminations may not be seen externally, but they affect the growth, division and greening of small samples. Mercuric chloride is mainly used as a surface disinfectant along with sodium hypochlorite and it controls the spectrum of bacteria and fungi and increases the disinfection efficiency. The results of the study showed that mercuric chloride relatively controls the bacterial and fungal contamination of the samples, but it reduces the survival percentage of the samples in high concentration. It seems that some plants are sensitive to mercuric chloride and determining the appropriate amount of this substance plays a very important role in preparing a healthy and living specimen. Determining the duration of disinfectant treatment was also considered in various researches, so that sometimes carbendazim 1% fungicide for 20 minutes, 70% alcohol for 60 seconds, sodium hypochlorite 2.5% for 10 minutes. And 0.1% mercury chloride was used for 7 minutes to sterilize aloe vera sample. Considering the importance of plant tissue culture techniques and the need to create new protocols to reduce contamination and increase the number of healthy cultures, the main goal of this study is to create an efficient protocol for the disinfection of *Fritillaria* spp. onion explants in order to increase the efficiency of in vitro cultures.

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322

Materials and Methods

This study aimed to investigate the effect of time and different concentrations of sodium hypochlorite, carbendazim fungicide and mercuric chloride in inhibiting the contamination of inverted tulip bulbs *(Fritillaria* spp.*)* in tissue culture environment. So, an experiment was done as a completely randomized design at four replications in the biotechnology laboratory of Zanjan University during 2023. The experimental treatments consisted of 0.1% fungicide at different times (30, 25, 35 and 40 minutes), 5 levels of sodium hypochlorite (0,1, 1.5, 2, 2.5 and 3%) at different times (7, 9, 10, 12 and 15 minutes), 70% Ethanol at two different times (0,60 and 90 seconds) and mercury chloride (0,0.1 and 0.2%). Bulbs that collected from nature were transferred to the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Zanjan University and kept them in the refrigerator at 4°C for two weeks. After this period of time, the bulbs were washed with detergent and then remained in water for 30 minutes. Then they were disinfected by using the above-mentioned treatments: It should be noted that at the end of each step, *Fritillaria* bulbs were washed with sterile distilled water. Also, after the end of the disinfection treatments, the desired explants were cultured in MS basic culture medium. The statistical analysis of this experiment was carried out using SAS software, version 9.1. The differences between mean values were compared using Duncan's multiple range test method at the 5% significant level ($p < 0.05$).

Results and Discussion

The control of fungal and bacterial contamination, especially in relation to bulbous and bulbous plants that are in direct contact with the culture medium, is one of the basic steps in in vitro culture conditions. Applying different treatments including the use of fungicides, alcohol, sodium hypochlorite and mercuric chloride in the cultivation environment can help control fungal and bacterial contamination in the *Fritillaria spp.* plant. However, the application of such treatments can have a negative effect on the regeneration potential of the explants, so it is important to choose the appropriate treatment in a way that controls the fungal and bacterial contamination and on the other hand preserves the regeneration potential of the explants. This study investigated the effectiveness of various disinfection protocols on Laleh-Avgagun onion explants. While the lowest contamination (0%) was achieved using 0.1% fungicide for 40 minutes, 70% alcohol for 90 seconds, 3% sodium hypochlorite for 15 minutes, and 0.1% mercury chloride, this treatment significantly reduced explant survival and regeneration, causing browning. Conversely, applying 0.1% fungicide for 30 minutes, 70% alcohol for 60 seconds, 2% or 2.5% sodium hypochlorite for 12 or 10 minutes respectively, and 0.1% mercury chloride effectively reduced contamination while maintaining explant survival. This optimized protocol improved the growth and regeneration ability of the explants.Therefore, in the conditions of in vitro cultivation, the use of the mentioned treatments is recommended to control contamination and optimal reproduction of the bulbs of *Fritillaria* spp. plant.

Keywords: Disinfection, Extinction, *In vitro*, Mercuric chloride, Micropropagation

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۳، ص. ٤٦٥-٤٧۸

تأثیر زمان و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم، قارچ‌کش کاربندازیم و کلرید جیوه در مهار آلودگی پیاز لاله واژگون (*Fritillaria* spp.) در محیط کشت بافت

لطافت مرادی[۱] - سید نجم الدین مرتضوی[۲]* - میترا اعلایی[۳]
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۷

چکیده

رفع آلودگی به‌عنوان یک چالش اساسی در تکنیک کشت سلول، بافت و اندام گیاهی به‌شمار می‌رود. با اینکه روش‌های مختلفی برای این منظور وجود دارد، امّا توسعه روش‌های ضدعفونی مختص هر گونه یک عامل مهم در استقرار و موفقیت سیستم کشت بافت به‌شمار می‌رود. لذا، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر زمان و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم، قارچ‌کش کاربندازیم و کلرید جیوه در مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون (*Fritillaria* spp.) در محیط کشت بافت به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل قارچ‌کش ۰/۱ درصد در زمان‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه)، پنج سطح هیپوکلریت سدیم (صفر ، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد) در زمان‌های مختلف (صفر ، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه)، الکل ۷۰ درصد با زمان (صفر ، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و کلرید جیوه (صفر ، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با وجود اینکه کمترین درصد آلودگی در زمان ۴۰ دقیقه قارچ‌کش کاربندازیم، الکل ۷۰ درصد در زمان ۹۰ ثانیه، غلظت ۳ درصد و زمان ۱۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم و غلظت ۰/۲ درصد کلرید جیوه حاصل شد، امّا میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به کمترین میزان کاهش یافت و باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها شد. طبق نتایج حاصل، بهترین تیمار با رفع آلودگی ۸۰ درصد و درصد زنده‌مانی بالا، زمان ۳۰ دقیقه قارچ‌کش، زمان ۶۰ ثانیه الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به‌ترتیب به‌مدت ۱۲ و ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت هفت دقیقه بود. لذا استفاده از تیمارهای ذکر شده در شرایط درون شیشه‌ای، جهت کاهش آلودگی و ریزازدیادی پیازهای گیاه لاله واژگون پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: انقراض، درون شیشه‌ای، ریزازدیادی،کمیاب، گندزدایی

مقدمه

لاله واژگون[۲] یکی از گیاهان زینتی موجود در خانواده Liliaceae بوده و این تیره شامل گیاهانی غالباً علفی و دارای پیاز می‌با شد. لاله واژگون به‌دلیل زیبایی ناشی از واژگونی گل‌ها، بازارپسندی بالایی دارد و در بازار کشورهای آمریکایی و اروپایی توجه خاصی به این گیاه نشان می‌دهند (Mohammadi Deh-Cheshmeh *et al*., 2008). گیاه لاله واژگون از لحاظ زیبایی محیط و جذب اکوتوریست نیز حائز اهمیت است. بر اساس سیاست‌های سازمان حفاظت محیط زیست به‌عنوان ذخیره ژنتیکی و عنصر زیبایی شناختی قلمداد شده و نیاز به حفاظت دارند، زیرا به نظر می‌رسد که با توجه به پراکنش محدود و متراکم، جاده سازی، بردا شت گل و پیاز، بقای لاله واژگون در آینده با چالش‌هایی روبه‌رو خواهد شد (Eslamzadeh *et al*., 2009).

این گیاه جزء گیاهان سمی مراتع نیز بوده و ترکیبات شیمیایی موجود در آن دارای اثرات دارویی مهمی می‌باشد، به‌طوری‌که وجود ترکیبات آلکالوئیدی و گلیکوزیدی برای آن گزارش شده است. این ترکیبات شیمیایی برای درمان دردهای روماتیسمی، بیماری‌های سیستم لنفاوی و نیز به‌عنوان پاک‌کننده کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه زینتی قابلیت تولید گلدانی را نیز دارا بوده و صادرات

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: mortazavi46@gmail.com)
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322
2- *Fritillaria* spp.

آن به‌صورت گلدانی امکان‌پذیر می‌باشد (Afifian, 2010). در حال حاضر، برای فایق آمدن بر مشکلات روش‌های معمول تکثیر این گیاه زینتی و تولید گیاهان عاری از آلودگی، استفاده از روش‌های کشت درون شیشه‌ای در این گیاه اهمیت زیادی پیدا کرده است. فلس سوخ از مرسوم‌ترین ریزنمونه‌های کشت بافت لاله واژگون است، امّا اغلب با آلودگی داخلی و خارجی قارچی و باکتریایی بسیار بالا مواجه است. مدیریت صحیح منابع ژنتیکی در این گونه، ضمن حفاظت از ذخایر ژنتیکی، منجر به استفاده از آن در برنامه‌های اصلاح و ارائه محصولی جدید در سطح جهانی خواهد شد که این امر یکی از رموز موفقیت در گلکاری نوین در جهان می‌باشد. تکثیر درون شیشه‌ای این گونه گیاهان که از راه‌های سنتی نیز با محدویت در ازدیاد مواجه هستند، مزایای قابل توجهی دارد. این گونه‌ها به‌علت برداشت گل و پیاز توسط گردشگران و چرای دام‌ها در رویشگاه‌های طبیعی و به‌خصوص انواع آلودگی‌های درون‌زاد، از لحاظ اقلیم نیز دچار تهدید شده‌اند (Sadr *et al*., 2019).

در کشت درون شیشه‌ای گیاهان پیازی، وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مشکلات اساسی می‌باشند که می‌تواند کارایی این نوع روش‌های تکثیری را تحت تأثیر قرار دهند. آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مهم‌ترین عوامل مشکل‌ساز در روش‌های مختلف کشت درون شیشه‌ای می‌باشند (Telem *et al*., 2016). از جمله این عوامل می‌توان به قارچ‌های جنس باکتری‌های *Penicillium*، *Aspergillus*، *Pectobacterium*، *Alternaria*، *Erwinia* و *Ralstonia* اشاره نمود. برای جلوگیری از این نوع آلودگی‌ها، برخی ترکیبات در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند که به نظر می‌رسد کاربرد این ترکیبات برای کم کردن یا از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی و ضدقارچی در محیط کشت درون شیشه‌ای می‌تواند میزان آلودگی را تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش دهد (Mihaljević *et al*., 2013). در آزمایشی بررسی شده است که در ریزنمونه فلس، حتی در بهترین حالت، آلودگی به‌طور کامل ریشه‌کن نمی‌شود. آلودگی داخلی بسیار بالا در لاله واژگون از موانع عدم موفقیت نسبی یا کامل در کشت بافت این جنس است و محققین معتقدند باید ریزنمونه‌های جایگزین مانند اندام های هوایی مورد استفاده قرارگیرد (Gholami, Hamidoghli *et al*., 2015; Mohammadi Deh Cheshmeh *et al*., 2007). استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده سطحی یکی از روش‌های ممکن برای کاهش این آلودگی‌ها است. برای گندزدایی سطحی عموماً از الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم و کلریدجیوه استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای کنترل آلودگی‌های داخلی و خارجی مؤثر هستند. آلودگی‌های داخلی معمولاً چندین هفته بعد از کشت ظاهر می شوند. این آلودگی‌ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، امّا بر روی رشد، تقسیم و سبز شدن ریز نمونه‌ها تأثیر می‌گذارند (Reed *et al*., 1995). کلریدجیوه به‌عنوان یک ضدعفونی‌کننده سطحی عمدتاً همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود و کنترل طیف باکتری‌ها و قارچ‌ها و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد. نتایج بررسی نشان داد که کلریدجیوه به‌طور نسبی آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌ها را کنترل می‌کند، امّا درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها را در غلظت بالا کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد برخی گیاهان نسبت به کلرید جیوه حساس باشند و تعیین مقدار مناسب این ماده نقش بسیار مهمی در تهیه ریزنمونه سالم و زنده دارد. تعیین مدت زمان تیمار ضدعفونی‌کننده در تحقیقات مختلف هم مورد توجه قرار گرفت، به‌طوری‌که گاهی از قارچ-کش کاربندازیم یک درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت هفت دقیقه برای استریل کردن نمونه‌های آلوئه‌ورا استفاده شده است (Hamidoghli *et al*., 2015).

کاربندازیم، قارچ‌کشی سیستمیک و عمومی است، که در کنترل بسیاری از آلودگی‌های قارچی کاربرد دارد و از آن به‌عنوان یک قارچ کش عمومی استفاده می‌شود. نتایج برخی گزارش‌ها نشان می‌دهد که تیمار گیاهچه‌ها قبل از ضدعفونی با این قارچ‌کش می‌تواند کارایی ضدعفونی را افزایش دهد (Zhang *et al*., 2007). با توجه به اهمیت تکنیک‌های کشت بافت گیاهی و لزوم ایجاد پروتکل‌های جدید برای کاهش آلودگی و افزایش تعداد کشت‌های سالم، هدف اصلی این مطالعه، ایجاد یک پروتکل کارآمد برای ضدعفونی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون به‌منظور افزایش کارایی کشت‌های درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه باغبانی– دانشکده کشاورزی– دانشگاه زنجان در تابستان سال ۱۴۰۱ انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل قارچ‌کش ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در زمان‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه)، پنج سطح هیپوکلرید سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳) در زمان‌های مختلف (شاهد (فقط آب مقطر)، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه)، الکل ۷۰ درصد با زمان (صفر، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و کلرید جیوه (شاهد (فقط آب مقطر)، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) جهت بررسی زنده‌مانی و مهار آلودگی در ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون اجرا گردید.

مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه

پیازهای گیاه لاله واژگون در تیرماه سال ۱۴۰۱ از منطقه حفاظت شده شهرستان ماهنشان استان زنجان جمع‌آوری و به آزمایشگاه گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انتقال یافت. حوزه مورد مطالعه منطقه ماهنشان با وسعتی بالغ بر پنج هزار هکتار در دو منطقه

کوهستانی واقع شده، شهرستان ماهنشان از شمال به شهرستان زنجان، از شمال باختری به شهرستان چاراویماق (استان آذربایجان شرقی)، از باختر به شهرستان تکاب (استان آذربایجان غربی)، از خاور به شهرستان زنجان، از جنوب خاوری به شهرستان ایجرود و از جنوب به شهرستان بیجار (استان کردستان) محدود می‌شود. این شهرستان در ۴۷ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۴۷ درجه و ۵۹ دقیقه در ازای خاوری و ۳۶ درجه و ۲۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۵۹ دقیقه پهنای شمالی واقع شده است. مرکز این شهرستان نیز در ۴۷ درجه و ۴۰ دقیقه درازای خاوری و۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه پهنای شمالی و ارتفاع ۱۳۰۰ متری از سطح دریا واقع شده است. براساس مطالعات انجام شده ۲۹ گونه بوته و درختچه، ۹۶ نوع علفی‌های پهن برگ و ۴۶ گونه گرامینه و شبه‌گرامینه در محدوده مورد مطالعه وجود دارد (Zamanzadeh Darban & Joulii Tehrani, 2020).

ضدعفونی سطحی و کنترل آلودگی

پیازهای جمع‌آوری شده از طبیعت به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی گروه باغبانی دانشگاه زنجان انتقال و به‌مدت دو هفته برای گذرانده دوره سرمای مورد نیاز در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بعد از این مدت، پیازها با مایع ظرفشویی شستشو شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس، به‌ترتیب با استفاده از پنج آزمایش زیر کنترل آلودگی سطحی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون انجام شد.

آزمایش اول: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون با استفاده از قارچ‌کش کاربندازیم (۰/۱ گرم در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر) در زمان‌های مختلف (شاهد (فقط آب مقطر)، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه) ضدعفونی گردید.

آزمایش دوم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون با استفاده از الکل ۷۰ درصد (اتانول ۹۶ درصد) در سه بازه زمانی (شاهد (فقط آب مقطر)، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) گندزدایی شد.

آزمایش سوم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد) ضدعفونی شد.

آزمایش چهارم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در بازه زمانی مختلف هیپوکلریت سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه) گندزدایی گردید.

آزمایش پنجم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه (شاهد (فقط آب مقطر)، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) به‌مدت هفت دقیقه برای ضدعفونی قرار گرفت.

آب مقطر برای هر آزمایش به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. همچنین، لازم به ذکر است که در آخر هر آزمایش ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون جهت رفع سموم موجود در ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شد. همچنین، بعد از تمام شدن زمان تیمارهای ضدعفونی، ریزنمونه‌های مورد نظر در محیط کشت پایه MS بدون هورمون کشت شدند (Teixeira & Dobranszki, 2014). در نهایت، درصد زنده‌مانی و درصد مهار آلودگی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Manole *et al*., 2012).

درصد مهار آلودگی = تعدادریزنمونه‌های آلوده / تعداد کل ریزنمونه‌ها ضربدر ۱۰۰

درصد زنده‌مانی = تعدادریزنمونه‌های زنده / تعداد کل ریزنمونه‌ها ضربدر ۱۰۰

آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS V9 و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تأثیر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم، مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون افزایش یافت، به‌طوری‌که با افزایش زمان از ۲۵ به ۴۰ دقیقه مهار آلودگی به‌طور معنی‌داری بهبود یافت (شکل ۱ الف). ولی بااین‌حال بر زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون تأثیر منفی داشت و درصد زنده‌مانی را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد (شکل ۱ ب). لذا طبق نتایج، بهترین زمان نگهداری برای گندزدایی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون ۳۰ دقیقه است، زیرا ریزنمونه‌ها کمترین آسیب را دیده و قدرت باززایی و رشد را حفظ می‌کند (شکل ۱).

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کاربرد قارچ‌کش‌ها می‌توانند به کنترل آلودگی در شرایط کشت بافت کمک نماید (Eed *et al*., 2010). براساس تحقیقات انجام شده، مؤثرترین تیمار در مقابل آلودگی قارچی، قارچ‌کش کاربندازیم می‌باشد (Ahmadi *et al*., 2012).

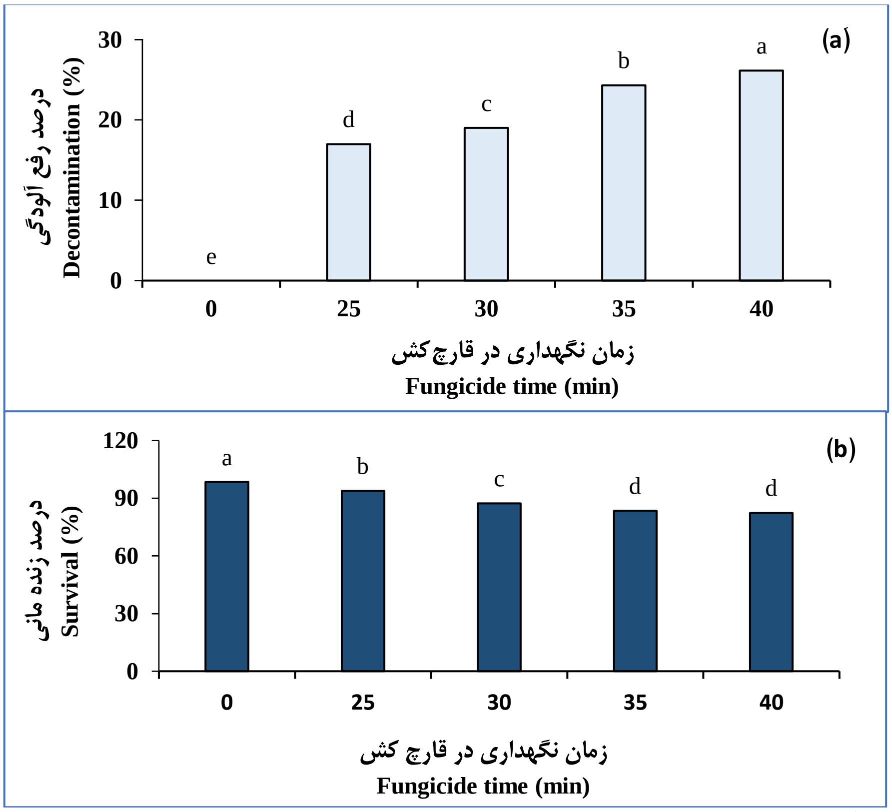
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

Table 1- ANOVA for the effect of soaking time in Carbendazim fungicide for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	1.9500	13.0086
زمان Time	4	322.7666**	141.6773**
خطا Error	8	0.6166	2.2428
ضریب تغییرات C.V (%)	-	4.53	1.68

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively.



شکل ۱- تأثیر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 1- The effect of soaking time in carbendazim fungicide for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p\leq 0.05$)

ازآنجایی‌که کاربندازیم، قارچ‌کشی سیستمیک و عمومی است، در طیف وسیعی برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های گیاهی در محصولات زراعی، باغی و زینتی استفاده می‌شود. کاربندازیم به‌صورت پودر خاکستری رنگ است و قابلیت حلالیت بالایی در آب دارد. این قارچ‌کش به‌سرعت از طریق برگ و ریشه توسط گیاه جذب می‌شود، لذا جهت حذف قارچ‌های داخلی مفید می‌باشد. محققین گزارش کردند که استفاده از تیمارهای قارچ‌کش (نظیر کاربندازیم با غلظت ۰/۵ درصد) قبل از کشت نمونه‌ها، می‌تواند به کاهش آلودگی قارچی کمک نماید (Smith, 2013; Mng'omba *et al.*, 2012). آلتان و همکاران (Altan *et al.*, 2010)، از تیمارهای شیمیایی مختلفی برای کنترل

آلودگی میکروبی در کشت درون شیشه‌ای لیلیوم استفاده کردند و بهترین پاسخ را پس از اعمال ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاربندازیم به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیستاتین به‌مدت ۳۰ دقیقه مشاهده نمودند. نتایج مشابهی نیز در بذر کاج (Allen *et al*., 2004; Barnett) گزارش شده است. کاربرد محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر کاربندازیم باعث حذف کامل آلودگی از ریزنمونه‌های گیاه انجدان رومی گردید. در این تحقیق، افزایش غلظت کاربندازیم در محیط کشت تأثیر منفی بر باززایی ریزنمونه‌ها داشت، روش‌های مختلف ضدعفونی و استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل آلودگی در محیط درون شیشه ای مورد استفاده و توصیه شده است، ولی برخی از این‌ها بهره‌وری پایین و برخی هم اثرات سمی زیادی روی ریزنمونه‌ها دارند .(Khatibzadeh *et al*., 2013)

تأثیر زمان نگهداری در الکل بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر زمان نگهداری در الکل ۷۰ درصد برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون با افزایش زمان نگهداری در الکل ۷۰ درصد افزایش یافت، به‌طوری‌که با افزایش زمان از ۶۰ به ۹۰ ثانیه سبب افزایش معنی‌دار مهار آلودگی گردید (شکل ۲ الف). ولی نگهداری به مدت ۹۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد. در این صورت، بیشتر ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شده و رشد و باززایی ریزنمونه‌های گیاهی کاهش یا کاملاً از بین رفت (شکل ۲ ب). بر همین اساس، بهترین زمان نگهداری در الکل برای گندزدایی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون ۶۰ ثانیه بود که سبب مهار آلودگی بیشتر و آسیب کمتر ریزنمونه‌ها گردیده و قدرت رشد و باززایی را حفظ کرد (شکل ۲).

گزارش شده است که استفاده از الکل ۷۰ درصد برای گندزدایی ریزنمونه‌ها، سبب حذف لایه روی سطح کوتیکول شده و در نتیجه، محلول ضدعفونی‌کننده اصلی می تواند قدرت نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت نمونه‌ها داشته باشد (Harum, 2013). ازآنجایی¬که اولین مرحله کشت سلول و بافت گیاهی شامل انتقال ماده گیاهی از محیط خارج آزمایشگاه به شرایط آزمایشگاهی است، ضدعفونی و استقرار کشت‌ها یک مرحله مهم از پروتکل‌های ریزازدیادی و کشت بافت محسوب می‌شود (Silva & Dobranszki, 2014). آلودگی همیشه در مراحل استقرار بروز نمی‌کند، بلکه برخی از آلاینده‌های داخلی هستند که بعد از مرحله کشت ظاهر شده و از بین بردن این نوع آلاینده با روش‌های معمول مشکل است. اگرچه روش‌های ضدعفونی مختلفی که توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرد، به گونه و نوع ریزنمونه بستگی دارد؛ بااین‌حال، با اتانول۷۰ درصد به‌تنهایی یا همراه با هیپوکلریت سدیم از جمله موادی هستند که به‌صورت بسیار متداول مورد استفاده قرار می‌گیرد (Karaoğlu *et al*., 2006). پژوهش‌های قبلی نشان داده اند، الکل ماده‌ای دهیدراته‌کننده می‌باشد که باعث تخریب غشای سلولی، واسرشت شدن سریع پروتئین‌ها و در ادامه برهم‌خوردن سوخت وساز سلول می‌شود (Cowan, 1999). از الکل ۷۰ درصد برای ضدعفونی بذرهای زوفا و ریحان نیز استفاده شده است که در این مرحله، هر چه ساقه‌های انتخابی جوان‌تر باشند میزان آلودگی داخلی کاهش یافته و فرایند استریل کردن با موفقیت بیشتری همراه خواهد بود (Ahmadi *et al*., 2012).

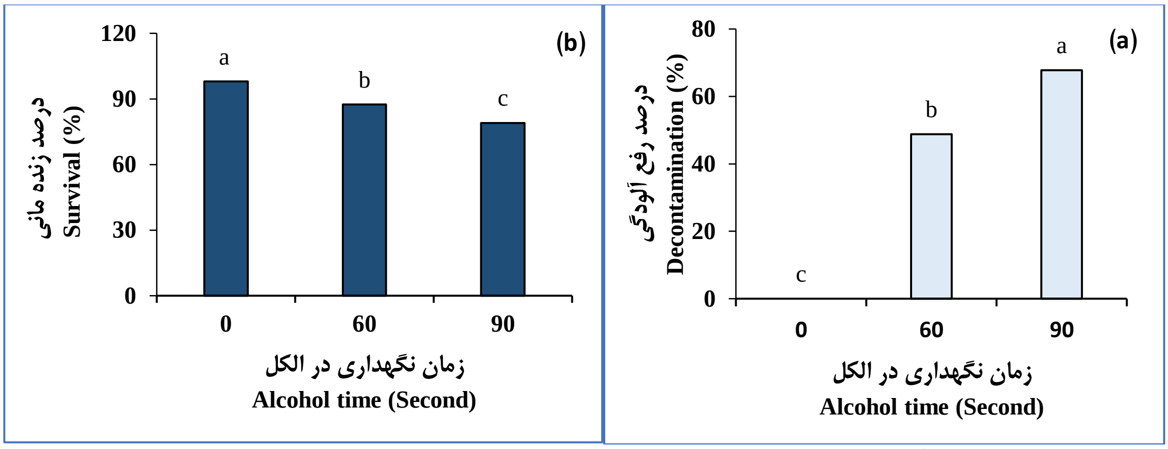
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

Table 2- ANOVA for the effect of soaking time in Alcohol for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	2.9011	12.3477
زمان Time	2	3644.6944**	271.8877**
خطا Error	4	0.8011	0.3361
ضریب تغییرات C.V (%)	-	2.30	0.65

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively.



شکل ۲- تأثیر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 2- The effect of soaking time in alcohol for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p\leq0.05$)

تأثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). استفاده از غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم آلودگی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را مهار کرد و کاربرد هیپوکلرید سدیم سه درصد بیشترین تأثیر را در رفع آلودگی پیاز لاله واژگون داشت (شکل ۳ الف). امّا افزایش غلظت این مهارکننده آلودگی، اثر منفی بر زنده‌مانی و رشد پیازها داشت. به‌طوری‌که بیشترین درصد رفع آلودگی و کمترین درصد زنده‌مانی با استفاده از هیپوکلرید سدیم سه درصد مشاهده شد (شکل ۳ ب). بر همین اساس، کاربرد هیپوکلرید سدیم ۲ و ۲/۵ درصد مناسب‌ترین تیمار برای مهار آلودگی و در عین حال، حفظ زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز بود (شکل ۳).

هنگامی که هدف کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، آلودگی های قارچی و باکتریایی می‌تواند لطمه‌های جبران ناپذیری به آن وارد آورد (Hosseini & Alizadeh, 2013). برای گندزدایی سطحی عموماً از هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای کنترل آلودگی‌های داخلی و خارجی مؤثر هستند. آلودگی‌های داخلی معمولاً چندین هفته بعد از کشت ظاهر می‌شوند. این آلودگی‌ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، امّا بر رشد، تقسیم و سبز شدن ریزنمونه‌ها تأثیر می‌گذارند (Reed *et al*., 1995).

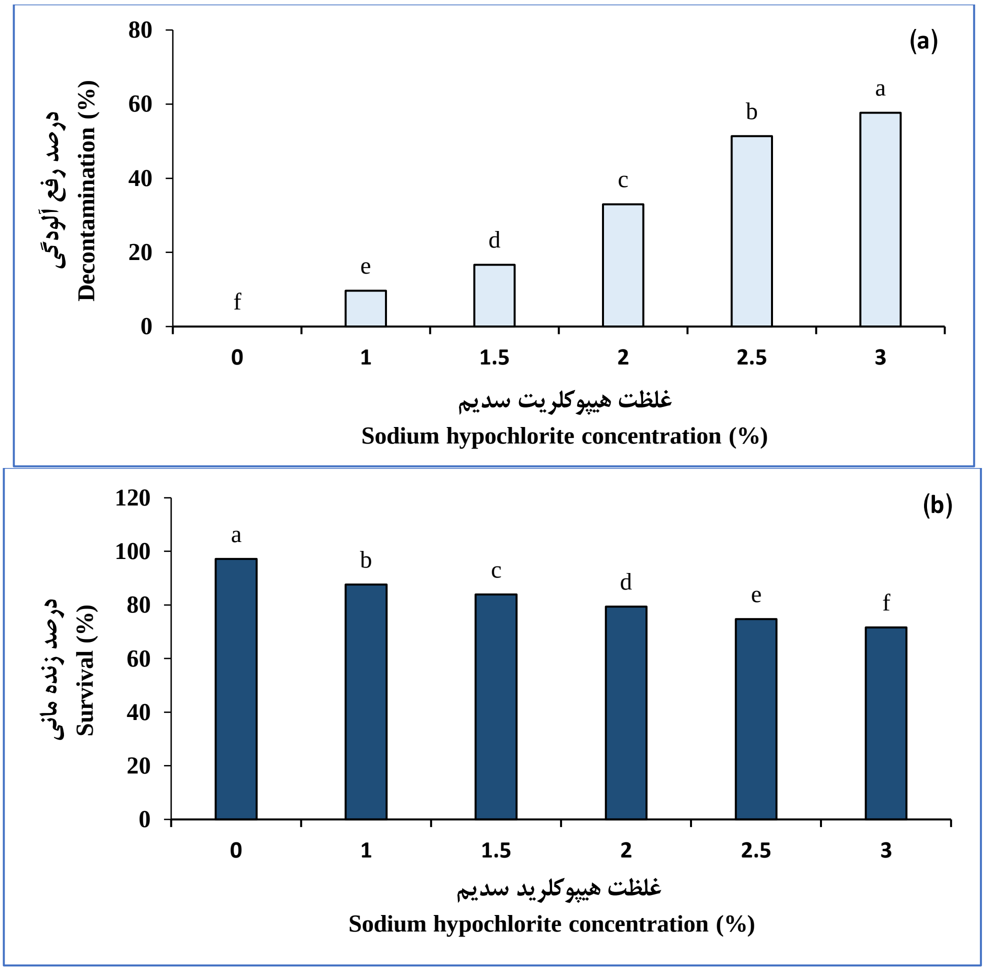
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

Table 3- ANOVA for the effect of different concentrations of sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	11.4444	0.1072
هیپوکلریت سدیم Sodium hypochlorite	5	8094.2777**	1281.3577**
خطا Error	10	0.7222	0.9125
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.02	1.15

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 3- The effect of different concentrations of sodium hypochlorite for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

هیپوکلریت سدیم بر ضدعفونی برخی از ارقام آلسترومریا مؤثر بوده است، با این وجود در بعضی از ارقام نیز تأثیر چندانی بر میزان آلودگی نداشته است (Abdi *et al.*, 2008). طیف وسیعی از مواد ضدعفونی‌کننده مانند پروکسید هیدروژن، اتانول، نیترات نقره، آب برم، کلرید جیوه و آنتی‌بیوتیک‌ها برای ضدعفونی سطحی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ولی بااین‌حال هیپوکلریت سدیم که به‌عنوان سفیدکننده تجاری شناخته شده است، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Smith, 2013). هیپوکلریت سدیم در برابر همه انواع باکتری‌ها قارچ ها و ویروس‌ها مؤثر است و با استفاده از اکسید کردن مولکول‌های زیستی مانند پروتئین، میکروب‌ها را می‌کشد (Yildiz & Er, 2002). یکی از موانع تکثیر گیاه زینتی نرگس طی شرایط کشت درون شیشه ای مهار آلودگی آن می‌باشد. طبق یافته‌های پیشین، کاربرد هیپوکلریت سدیم به‌منظور بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای منجر به کاهش یا حذف آلودگی در ریزنمونه‌های گیاه نرگس گردید (Yildiz & Er, 2002).

تأثیر زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۴). افزایش مدت زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم از ۷ به ۱۵ دقیقه منجر به افزایش ۸۷/۵۴ درصدی در مهار آلودگی پیاز لاله واژگون گردید (شکل ۴ الف). با افزایش زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم درصد زنده‌مانی پیازها کاهش یافت و کمترین میزان باززایی ریزنمونه‌های پیازدر زمان نگهداری به‌مدت ۱۵ دقیقه مشاهده شد، به‌طوری‌که باعث قهوه ای شدن ریزنمونه‌های پیاز گردید (شکل ۴ ب). با توجه به درصد مهار آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، زمان ۱۰ و ۱۲ دقیقه موثرترین تیمار برای کاهش آلودگی و بهبود رشد و باززایی نمونه‌ها بود (شکل ۴).

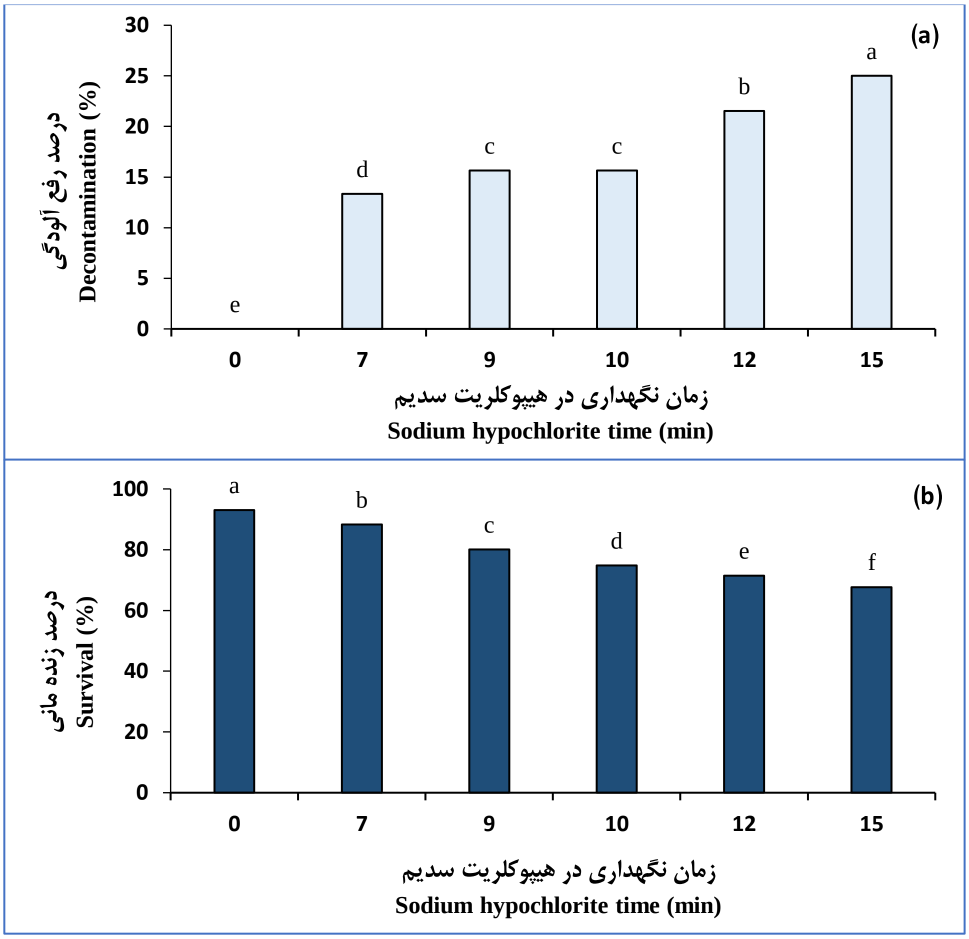
جدول ٤- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های لاله واژگون

Table 4- ANOVA for the effect of storage time in sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	0.3405	23.6538
زمان Time	5	222.9088**	291.7435**
خطا Error	10	0.3398	1.4445
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.82	1.51

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p≤0.01$ and $p≤0.05$, respectively.



شکل ٤- تأثیر زمان‌های مختلف تیمار هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 4- The effect of different times of sodium hypochlorite for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p≤0.05$)

اندام‌هایی نظیر ریزوم، استولون و سوخ که زیر خاک تشکیل می گردند، علائم شدید آلودگی را طی مراحل کشت بافت از خود نشان می‌دهند، که با اعمال تیمارهایی نظیر غلظت‌های بالا مواد ضدعفونی‌کننده و افزایش مدت زمان اعمال تیمار ضدعفونی، می‌توان علائم آلودگی را تا حدودی کاهش داد. بااین‌حال با اعمال چنین تیمارهایی، گاهی اوقات آلودگی در سطح بالا مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد که قارچ‌های عامل آلودگی بدون بروز هیچ‌گونه علائم ظاهری، در داخل بافت‌های گیاهی قرار دارند که پس از کشت، این علائم ظاهر می‌شوند. بنابراین، ضروری به نظر می‌رسد که روش‌های دیگر نظر اعمال تیمار حرارتی و زمان‌ها و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم جهت کنترل آلودگی داخلی بافت‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد (Kharrazi *et al*., 2016). روش مورد استفاده در گندزدایی می‌تواند تابع عوامل مختلف گیاهی یا محیطی مانند گونه گیاهی، سن، نوع ریزنمونه، میزان سمیت عامل گندزدا، نوع آلودگی، هزینه اقتصادی و شرایط محیطی حاکم بر آن باشد (Mng'omba *et al*., 2012). ترکیبات گندزدا برای بافت‌های گیاهی سمی می‌باشند و کاربرد غلظت مناسب، مدت زمان قرارگیری ریزنمونه در معرض عوامل گندزدا و ترتیب استفاده از این مواد باید برای به حداقل رساندن آسیب به بافت و حداکثر زنده‌مانی ریزنمونه‌ها بهینه‌سازی شود (Mahmoud & Al-Ani, 2016). برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها، استفاده از الکل به اضافه هیپوکلریت سدیم عنوان بهترین تیمار ضدعفونی معرفی شده طی انجام ضدعفونی، مواد زنده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست دهند و تنها باید آلودگی حذف گردد، بنابراین باید غلظت مواد مورد استفاده و مدت زمان اعمال تیمارهای مورد نظر به‌طور متعادل با توجه به نوع ریزنمونه تعیین گردد (Khatibzadeh *et al*., 2013).

در آزمایشی تحت عنوان تیمارهای بذر برای مدیریت بیماری باکتریایی لکه‌برگی، کاربرد هیپوکلریت سدیم با غلظت دو و پنج درصد به‌مدت ۱۵ و ۵ دقیقه در کاهو نشان داد که تیمار بذور کاهو روی کنترل آلودگی باکتریایی نسبتاً بی اثر بوده و تیمار بذور با هیپوکلریت سدیم با غلظت یک درصد برای ۱۵ دقیقه توانست آلودگی باکتریایی را به‌میزان دو درصد کاهش دهد (Pernezny *et al*., 2002).

تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری نشان داد (جدول ۵). استفاده از غلظت‌های مختلف کلرید جیوه درصد مهار آلودگی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد، ولی بین غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلرید جیوه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵ الف). افزایش غلظت این مهارکننده آلودگی اثر منفی بر زنده‌مانی و رشد پیازها داشت، به‌طوری‌که افزایش غلظت کلرید جیوه از ۰/۱ به ۰/۲ درصد سبب کاهش ۳۰/۲۵ درصدی زنده‌مانی ریزنمونه‌ها گردید و بالاترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در این تیمار مشاهده شد (شکل ۵ ب). از آنجایی‌که اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلرید جیوه در مهار آلودگی وجود نداشت، لذا مؤثرترین تیمار بود (شکل ۵).

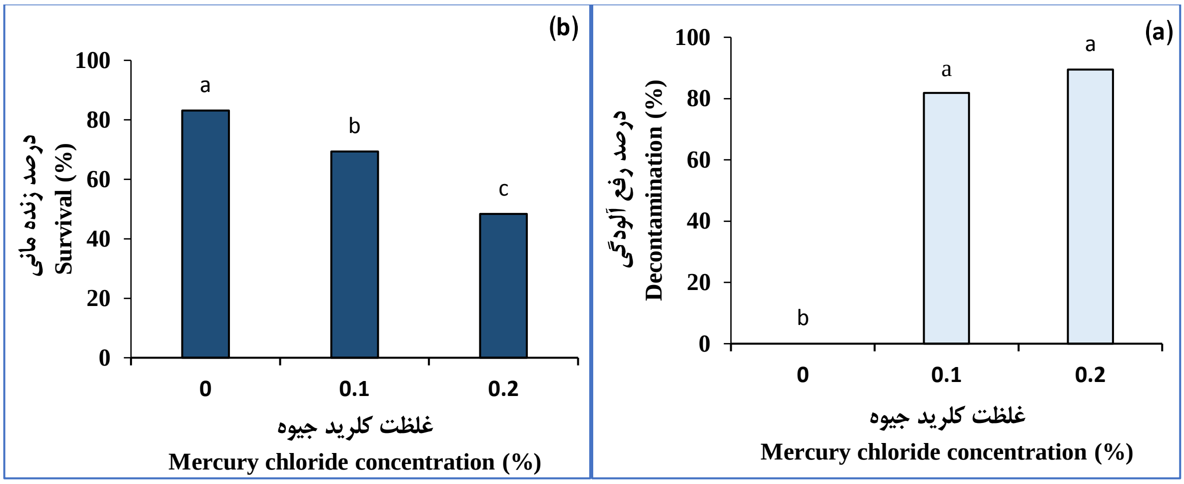
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

Table 5- ANOVA for the effect of different concentrations of Mercury chloride for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	1.1077	10.0133
کلرید جیوه Mercury chloride	2	7373.9144**	918.4933**
خطا Error	4	1.0327	1.3266
ضریب تغییرات C.V (%)	-	1.78	1.71

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant,and significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

Figure 5- The effect of different concentrations of mercuric chloride on decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

کلرید جیوه به‌عنوان یک ضدعفونی کننده سطحی عمدتاً همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود و کنترل طیف وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها را بر عهده دارد و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد. نتایج مطالعات پژوهشی نشان داده است (Alam *et al*., 2010) که کلرید جیوه به‌طور نسبی آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌ها را کنترل می کند، امّا درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های گل نیلوفر را کاهش داد، به¬طوری‌که در یکی از ارقام باعث مرگ کامل ریزنمونه‌ها شد. به نظر می‌رسد برخی گیاهان نسبت به کلرید جیوه حساس باشند و تعیین مقدار مناسب این ماده نقش بسیار مهمی در تهیه ریزنمونه سالم و زنده دارد (Alam *et al*., 2010). لازم به توضیح است که با افزایش میزان کلرید جیوه به‌کار رفته برای ضدعفونی از ۰/۰۳ درصد بـه ۰/۱ درصد، رشد گیاهچه‌ها کاهش یافت؛ به‌طوری‌که در تیمار ۰/۱ درصد، ریزنمونه‌ها فقط سبز شدند و به‌ندرت شاخه تولید کردند. همچنین، ریز نمونه‌هایی که در غلظت ۰/۰۳ درصد کلرید جیوه ضدعفونی شده بودند، شاخه‌هایی تولید کردند که از لحاظ ظاهری ضعیف‌تر بوده و به‌سختی ریشه تولید می‌کردند. در گل پریوش علی‌رغم کنترل کامل آلودگی ریزنمونه‌ها، تمام غلظت‌های اعمال شده باعث عدم رشد ریزنمونه‌ها شد. آزمون تترازولیوم، مرگ ریزنمونه‌ها را تأیید نمود (Sain & Sharma, 2013). گزارش‌هایی در مورد تأثیر کلریدجیوه بر مرگ ریزنمونه‌ها وجود دارد. در پژوهشی، استفاده از غلظت ۰/۱ درصد کلرید جیوه در زمان‌های متفاوت برای سنجش میزان آلودگی، زنده‌مانی و مرگ‌ومیر جوانه‌های انگور استفاده شد (Kashif, 2005). پژوهشی در گیاه آلوئه‌ورا نشان داد که بهترین روش ضدعفونی، کاربرد اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت یک دقیقه، با هیپوکلرید سدیم سه درصد و زمان نه دقیقه بود (Shamsian *et al*., 2016). همچنین، کلرید جیوه ۰/۱ درصد مؤثرترین تیمار ضدعفونی در کنترل آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های آلوئه‌ورا است (Saggoo & Kaur, 2010) که با نتایج این پژوهش همسویی دارند. در آزمایشی از کلریدجیوه ۰/۱ درصد برای کاهش آلودگی ریزنمونه حاصل از گره گیاه همیشه‌سبز چند ساله *Operculina turpethum* استفاده نموده و نتایج مثبتی از نظر کنترل آلودگی گزارش کردند. به نظر می‌رسد که در گیاه آلسترومریا غلظت بالاتر از ۰/۱ درصد باعث مرگ ریز نمونه‌ها می‌شود و استفاده از غلظت‌های کمتر و زمان‌های کوتاه‌تر می‌تواند راه حلی برای کاهش آلودگی در این گیاه می‌باشد (Alam *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری

کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی، به‌خصوص در رابطه با گیاهان سوخ‌دار و پیازی که در تماس مستقیم با بستر کشت می‌باشند، یکی از مراحل اساسی در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. اعمال تیمارهای مختلف از جمله کاربرد تیمارهای قارچ‌کش، الکل، هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه در محیط کشت می‌تواند به کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی در گیاه لاله واژگون کمک نماید. بااین‌حال، اعمال چنین تیمارهای می‌تواند تأثیر منفی بر پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها داشته باشد، لذا انتخاب تیمار مناسب به‌نحوی‌که باعث کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی و از سوی دیگر، حفظ پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها گردد، حائز اهمیت می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، با وجود آنکه کمترین درصد آلودگی در شرایط اعمال قارچ‌کش ۰/۱ درصد به‌مدت ۴۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۹۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم سه درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۲ درصد به‌دست آمد؛ امّا درصد زنده‌مانی و قابلیت باززایی نمونه‌ها را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داده و

باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردید. بر همین اساس، کاربرد قارچ‌کش ۰/۱ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به‌ترتیب به‌مدت ۱۲ و ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد با کاهش درصد آلودگی و حفظ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، توان رشد و باززایی ریزنمونه‌های پیاز لاله‌واژگون را بهبود بخشید. لذا در شرایط کشت درون شیشه‌ای، استفاده از تیمارهای ذکر شده جهت مهار آلودگی و تکثیر بهینه پیازهای گیاه لاله واژگون توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

تشکر و قدردانی از مسئولین محترم منابع طبیعی و اداره محیط زیست شهرستان ماهنشان که در انجام این پژوهش دانشجویی مساعدت کافی را داشته‌اند.

References

1- Abdi, G., Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, *30*, 709-714. https://doi.org/10.1007/s11738-008-0169-z

2- Afifian, M. (2010). Identification and determination of some active ingredients of *Fritillaria imperialis* and relation of it to the habitat conditions, western area of Isfahan province. M.Sc. Thesis Natural Resources Faculty, Isfahan University of Technology, Iran.

3- Ahmadi, E., Nasr, S.M.H., Jalilvand, H., & Savadkoohi, S.K. (2012). Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christti] seed *in vitro* culture. *Trees*, *26*, 1299-1304. https://doi.org/10.1007/s00468-012-0705-8

4- Alam, J., Alam, I., Sharmin, S.A., Rahman, M., Anisuzzaman, M., & Alam, M.F. (2010). Micropropagation and antimicrobial activity *of Operculina turpethum'* (Syn.'*Ipomoea turpethum*'), an endangered medicinal plant. *Plant Omics*, *3*(2), 40-46.

5- Allen, T.W., Enebak, S.A., & Carey, W.A. (2004). Evaluation of fungicides for control of species of *Fusarium* on longleaf pine seed. *Crop Protection*, *23*(10), 979-982. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.02.010

6- Altan, F., Bürün, B., & Sahin, N. (2010). Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. *African Journal of Biotechnology*, *9*(7), 991-995. https://doi.org/10.5897/AJB08.090

7- Barnett, J.P., & McGilvray, J.M. (2002). Reducing Seed and Seedlings Pathogens Improves Longleaf Pine Seedlings Production. *In: Gen. Tech. Rep. SRS-56. Asheville, NC: US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. p. 19-20.*

8- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Aicrobiology Reviews*, *12*(4), 564-582. https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564

9- Eed, A.M., Reddy, S.A., Reddy, K.M., Silva, J.A.T., Reddy, P.V., Beghum, H., & Venkatsubbaiah, P.Y. (2010). Effect of antibiotics and fungicides on the *in vitro* production of *Citrus limonia* Osbeck nodal segment and shoot tip explants. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, *4*(1), 66-70.

10- Eslamzadeh, N., Hoseini, H., Moradi, H., & Dehkordi, F. (2009). Introduction of new habitat for the *Fritillaria*, a GIS. *Production and Processing of Agricultural and Horticultural Products Journal*, 8(16), 556-582.

11- Gholami, M. (2007*). Micropropagation of of inverted tulip (Fritillaria imperialis* L.*).* Doctoral Dissertation, M.Sc. Thesis, University of Avicenna. Hamedan, Iran.

12- Hamidoghli, S., Chamani, E., Hamidoghli, Y., & Talei, N. (2015). Effect of different plant growth regulators on direct bulblet regeneration from scale explants of *Fritillaria imperialis*. *Isfahan University of Technology Journal of Crop Production and Processing*, *5*(16), 211-218. https://doi.org/10.18869/acadpub.jcpp.5.16.211

13- Harum, N. (2013). *Surface sterilization procedures for leaves explants of rhododendron (Rhododendron javanicum (Blume) Benn) cultured in vitro*. The third Basic Science International Conference, 21, 1-4.

14- Hosseini, B., & Alizadeh, M. (2013). Effect of biomass and BAP hormone on *in vitro* regeneration of medicinal herb (*Hyssopus officinalis L*.). *Journal of Horticulture*, 27, 207-201. (In persian)

15- Karaoğlu, C., Çöcü, S., Ipek, A., Parmaksız, I., Uranbey, S., Sarıhan, E., & Khawar, K. M. (2006, October). *In vitro* micropropagation of saffron. In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology*, *739* (223-227). https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.739.28

16- Kashif, M. (2005). Effect of duration of mercuric chloride treatment on culture viability, contamination and mortality of various accessions of grapes. *Sarhad Journal of Agriculture (Pakistan), 21*(1).

17- Kharrazi, M., Tehranifar, A., Nemati, H., & Bagheri, A. (2016). *Investigation of different methods of Amaryllis (Hippeastrum× johnsonii) culturing and propagation for increasing the proliferation rate during in vitro and greenhouse conditions* (Doctoral dissertation, Ph.D. Dissertation, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. (In Persian).

18- Khatibzadeh, R., Azizi, M., Arouiee, H., & Farsi, M. (2013). Effects of sterilization protocol and prechilling treatment on in vitro seed germination of *Levisticum officinale Koch*. *Journal of Horticultural Science*, 27(2), 130-138. https://doi.org/10.22067/JHORTS4.V0I0.24810

19- Mahmoud, S.N., & Al-Ani, N.K. (2016). Effect of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, *4*(1), 4-9. https://doi.org/10.20431/2349-0365.0401002

20- Manole, C.G., Balan, V., Mencinicopschi, I.C., Golea, D., Rodino, S., & Butu, A. (2012). The influence of growth regulators concentrations on *in vitro* micropropagation of *Ribes rubrum species. Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies*, Vol. XVI, 2012. ISSN-L 2285-1364.

21- Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Cmelik, Z., Puskar, B., & Jurkovic, Z. (2013). *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of' oblacinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences*, 58, 117-126. https://doi.org/10.2298/JAS1302117M

22- Mng'omba, S.A., du Toit, E.S., Akinnifesi, F.K., & Sileshi, G. (2012). Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria.

23- Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A., & Naderi, R. (2007). Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *10*(11), 1875-1879. https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1875.1879

24- Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M., & Ebrahimie, E. (2008). Petal: A reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis L. Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3), 395-399. https://doi.org/10.1007/s11738-007-0126-2

25- Pernezny, K., Nagata, R., Raid, R.N., Collins, J., & Carroll, A. (2002). Investigation of seed treatments of management of bacterial leaf *spot of lettuce. Journal of Plant Disease*, 151-155. https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.2.151

26- Reed, B.M., Buckley, P.M., & DeWilde, T.N. (1995). Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *31*, 53-57. https://doi.org/10.1007/BF02632228

27- Sadr, S.S., Zakizadeh, H, Naghavi, M.R., Olfati, J., & Hazrati, K. (2019). Introducing a tissue culture protocol for fritillaria (*Fritillaria raddeana*) via seed and bulb scales. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *49*(4), https://doi.org/10.22059/ijhs.2017.230135.1219

28- Saggoo, M., & Kaur, R. (2010). Studies in North Indian *Aloe vera*: Callus induction and regeneration of plantlets. *Archives of Applied Science Research*, *2*(2), 241-245.

29- Sain, M., & Sharma, V. (2013). International journal of pure and applied bioscience *Catharanthus roseus* (an anti-cancerous drug yielding plant)—A review of potential therapeutic properties. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, *1*(6), 139-142.

30- Shamsian, S., Omidi, M., & Torabi, C. (2016). effect of growth regulators and active charcoal on the proliferation of *Aloe vera* L. *in vitro*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *32*, 281-289.35.

31- Silva, J.A., & Dobránszki, J. (2014). Sonication (Ultrasound) affects *in vitro* growth of hybrid cymbidium. *Botanica Lithuanica (1392-1665), 20*(2). https://doi.org/10.2478/botlit-2014-0014

32- Smith, R.H. (2013), Amsterdam Academic Press, Plant *Tissue Culture. Techniques and Experiments*. pp. 188, £54.99. ISBN 978-012-415920-4.

33- Teixeira da Silva, J.A., & Dobranszki, J. (2014). Sonication (ultrasound) affects *In vitro* growth of hybrid *Cymbidium*. *Bot Lith*, *20,* 121-130

34- Telem, R.S., Sadhukhan, R., Mandal, N., Wani, S.H., Sarkar, H.K., & Naorem, B.S. (2016). Estimating the efficiency of different explants for direct *in vitro* multiple shoots development in chrysanthemum. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, *9*(3), 345-352. https://doi.org/10.5958/2230-732X.2016.00045.0

35- Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*, *89*, 259-261. https://doi.org/10.1007/s00114-002-0310-6

36- Zamanzadeh Darban, M., & Joulii Tehrani, M. (2020) Adventurer in Zanjan book. Travel and tourism books, Shakib Publications, p. 40.

37- Zhang, L.Z., Wei, N., Wu, Q.X., & Ping, M.L. (2007). Anti-oxidant response of *Cucumis sativus* L. to fungicide carbendazim. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(1), 54-59. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.02.007